

Destruction de caillots sanguins in vitro par cavitation ultrasonore

B. GILLES^a, J.C. BERA^a, M. BEN CHIEKH^b, A. JEMNI^b

a. Laboratoire d'Applications des Ultrasons à la Thérapie (LabTAU), UMR 1032 Inserm - Université Lyon 1, 161 cours A. Thomas, 69003 LYON (France)

b. Laboratoire d'Etudes des Systèmes Thermiques et Energétiques (LESTE), Ecole Nationale d'Ingénieurs de Monastir, Université de Monastir, 5000, MONASTIR (Tunisie)

Résumé :

Nous nous intéressons à la destruction de caillots sanguins au moyen de la cavitation produite par un système ultrasonore extracorporel. L'étude expérimentale des nuages de cavitation ultrasonore dans l'eau permet de trouver des paramètres de tir efficaces, qui sont validés par des mesures de destruction de caillot in vitro. Les expériences sur caillots fournissent aussi des indications sur la distribution de taille des débris susceptibles d'être relargués dans la circulation, et des simulations numériques de particules relâchées sont mises en œuvre pour étudier les possibilités de maintenir les débris jusqu'à leur destruction.

Abstract :

This research aims to help developing a system for blood clot destruction by extracorporeal ultrasound cavitation. Experimental studies are conducted on the acoustic parameters in order to optimize the cavitation efficiency with reduced thermal effect. In vitro measurements of blood clot lysis are carried out for validation, and the clot debris generated is quantified in size and number of fragments. The debris flow is investigated by numerical simulations in the scope of reducing large-scale particle release in circulation.

Mots clefs : ultrasons, cavitation, écoulement, thrombolyse

1 Thrombolyse extracorporelle par cavitation ultrasonore

Dans la perspective de développer un nouvel outil thérapeutique faiblement invasif pour la chirurgie cardiovasculaire, nous nous intéressons à un procédé de destruction (= lyse) d'un caillot sanguin (= thrombus) par une onde ultrasonore focalisée générée sur le caillot à partir de l'extérieur du corps. Les ultrasons de forte intensité sont utilisés en thérapie pour détruire des tissus cancéreux ou des calculs. Leur utilisation est proposée pour détruire les caillots sanguins obstruant totalement ou partiellement un vaisseau. Des sondes de contact ont été testées et s'avèrent efficaces, mais leur utilisation est invasive et présente des risques importants de perforation. L'utilisation de systèmes extracorporels apparaît donc particulièrement intéressante, d'autant que des travaux préliminaires montrent l'efficacité du procédé, malgré des lésions sur les parois vasculaires [1].

Avant d'envisager la mise en œuvre clinique du procédé de sonothrombolyse extracorporelle, il est donc nécessaire d'évaluer d'une part les dommages potentiels du tir sur les tissus autour du caillot traité et d'autre part les risques d'embolie secondaire liés au relargage de débris dans la circulation sanguine. Concernant tout d'abord le ciblage spatial du traitement, il doit être assuré par une bonne focalisation du faisceau ultrasonore, c'est-à-dire des fréquences suffisamment élevées. Par ailleurs, le principal mécanisme physique de la sonolyse est la cavitation ultrasonore [1]. Le signal d'excitation résulte donc d'un compromis entre une diminution de fréquence qui favorise la cavitation ultrasonore, et une augmentation qui améliore la focalisation mais au prix d'un niveau acoustique plus élevé. L'augmentation de l'intensité acoustique moyenne produit une augmentation directe de la lésion thermique. Pour tenter d'y remédier, il apparaît judicieux de tirer en régime pulsé, afin de limiter l'intensité ultrasonore moyenne tout en augmentant l'amplitude instantanée de l'onde qui est le principal paramètre de contrôle de la cavitation ultrasonore. Dans ce sens, certains chercheurs proposent d'utiliser des pulses très court et de très forte intensité, de type

histotritie [2], mais là aussi la localisation du traitement n'est plus nécessairement assurée, car la cavitation pourrait apparaître hors de la tâche focale, notamment sur les lobes secondaires. Nous préconisons plutôt d'essayer d'optimiser les caractéristiques du signal d'excitation pour réduire l'intensité acoustique nécessaire à la thrombolyse. Concernant les débris de thrombolyse, des travaux sont également nécessaires pour trouver des paramètres de traitement favorables permettant de limiter la formation de débris de grandes dimensions.

Nos travaux portent donc tout d'abord sur la dynamique des nuages de cavitation pour étudier notamment comment stimuler la cavitation à des intensités ultrasonores modérées, puis sur l'évaluation de l'efficacité de la lyse de caillots, et enfin sur le problème des débris de thrombolyse susceptibles d'être relargués dans la circulation.

2 Etude de la dynamique de nuages de cavitation

Nos essais expérimentaux sont réalisés avec un transducteur piézoélectrique focalisé (calotte sphérique de distance focale 10 cm et de diamètre d'ouverture 10 cm) de fréquence centrale 550 kHz, immergé dans une cuve d'eau dégazée (cf. figure 1). On fait varier l'intensité ultrasonore moyenne de l'onde au point focal entre 100 et 7000 W/cm². Afin d'étudier la dynamique des nuages de bulles, un fil de polyester de 0,1 mm de diamètre placé au foyer permet d'assurer le déclenchement reproductible de la cavitation. Lors du tir ultrasonore, un nuage de cavitation se développe autour du fil, et on visualise ce nuage au moyen d'une caméra rapide (Phantom v12.1). Le traitement de la vidéo permet d'évaluer principalement les dimensions du nuage et son évolution temporelle [3].

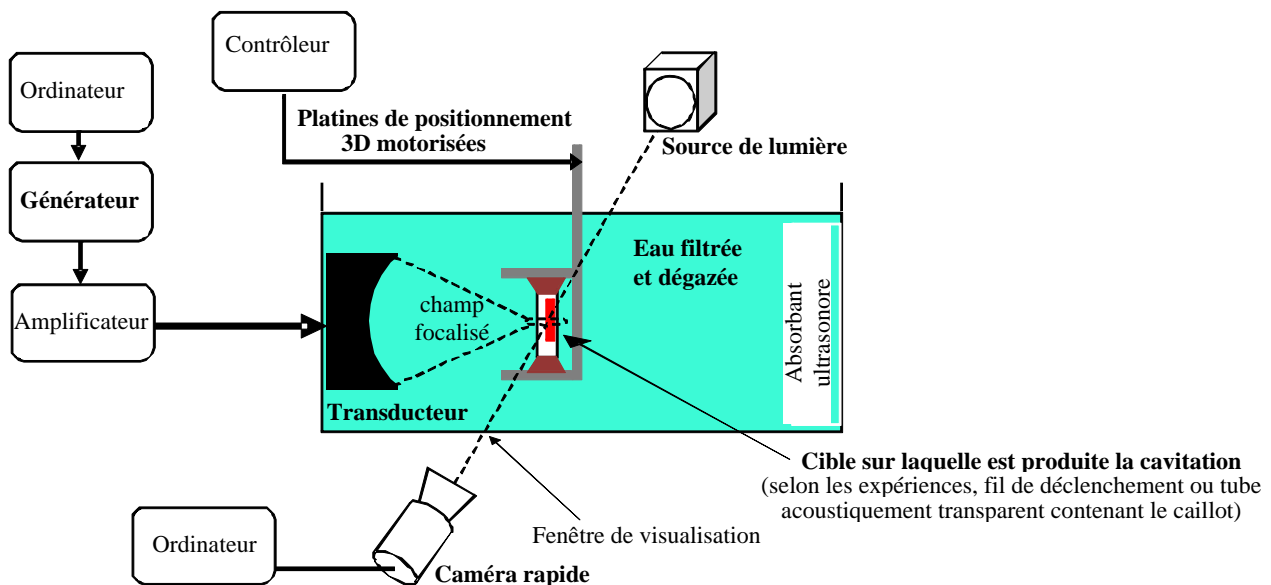


FIG. 1 – Schéma général du dispositif expérimental.

La figure 2 montre quelques images extraites d'une vidéo. On visualise clairement la hauteur du nuage (d'environ 2,5 mm, pour une excitation sinusoïdale à 2000 W/cm²), qui correspond au diamètre de la zone qui pourra être attaquée par la cavitation : on vérifie bien ainsi le caractère focalisé du nuage. On observe également le développement temporel du nuage, qui s'étend principalement vers l'aval sous l'effet de la pression de radiation qui pousse les bulles. On constate qu'après une phase de développement de l'ordre de la milliseconde, le nuage se stabilise globalement et ses dimensions restent alors constantes. Dans le cas d'une forte intensité (ou d'une eau non dégazée), le nuage peut aussi remonter vers l'amont par un phénomène de nucléation en chaîne qui engendre des filaments de bulles en forme d'éclairs.

Afin d'appréhender les temps caractéristiques d'établissement des nuages, des signaux d'excitation modulés en amplitudes à différentes fréquences de modulation (fréquences de battement Δf de 1 à 300 kHz) ont été testés. Il apparaît que dans tous les cas, la durée d'initiation du nuage de cavitation reste identique : on voit sur la figure 3 que le temps nécessaire à atteindre le niveau maximum de réponse est toujours d'environ 40 images (soit 0,8 ms).

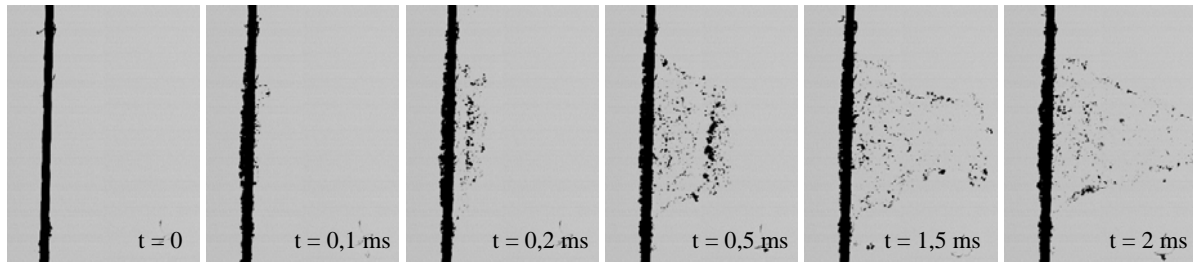


FIG. 2 – Exemple d’initiation d’un nuage de cavitation à forte intensité ultrasonore (2000 W/cm^2). L’onde acoustique propagative focalisée sur le fil de diamètre $0,1 \text{ mm}$ vient de la gauche de l’image.

En revanche, comme le montrent clairement nos visualisations stroboscopiques, le nuage apparaît et disparaît totalement au rythme du battement de l’excitation, et ce jusqu’à une cadence de 50 kHz , correspondant à seulement 10 périodes de l’excitation. Cela signifie que lorsque l’onde acoustique n’est plus émise, la cavitation cesse très rapidement, mais des germes de cavitation invisibles à l’échelle de notre visualisation demeurent et permettent aux bulles de se reformer quasi-instantanément lors de la reprise de l’onde : le temps de réaction d’un nuage de germes préexistants est beaucoup plus faible que le temps de développement du nuage de bulles, et ces deux phénomènes de réaction et d’extension du nuage apparaissent décorrélés. En pratique, l’utilisation de signaux d’excitation modulés ou pulsés, qui permet de diminuer l’intensité moyenne de l’onde, va donc se faire sans préjudice de l’activité de cavitation. A contrario, à même intensité, on observe un nuage plus développé (d’aire maximale plus grande) dans le cas de signaux modulés ou pulsé que pour une excitation sinusoïdale, comme on le voit sur la figure 3, en relation avec une pression crête plus élevée.

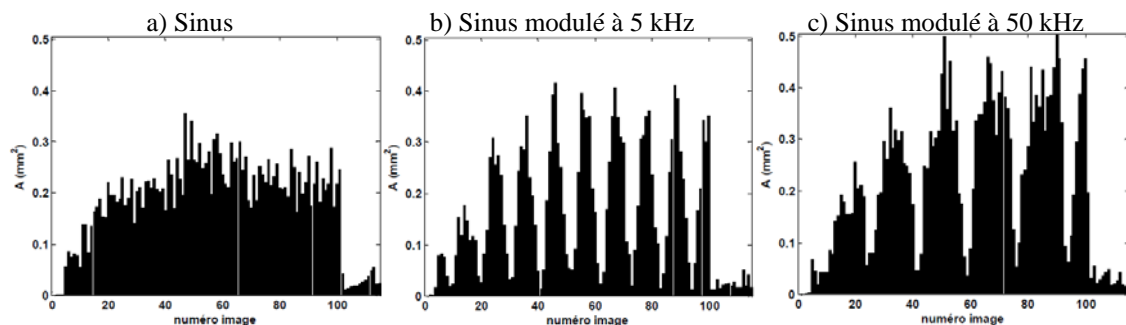


FIG. 3 – Evolution temporelle de l’aire A du nuage de bulles pour différentes ondes ultrasonores de même intensité 1000 W/cm^2 et de même fréquence centrale 550 kHz : excitation sinusoïdale continue (a), modulée avec une fréquence de battements de $\Delta f = 5 \text{ kHz}$ (b), et modulée avec $\Delta f = 50 \text{ kHz}$ (c). Compte tenu d’une fréquence d’échantillonnage de 53 kHz et du repliement spectral, les battements des signaux d’excitation modulés sont perçus à respectivement 5 kHz (b) et 3 kHz (c).

3 Mesure de destruction de caillots sanguins in vitro

Des travaux sont réalisés sur un modèle de caillot sanguin pour évaluer l’efficacité de la lyse causée par différents types d’excitation ultrasonore. Nous comparons notamment l’effet produit par une excitation sinusoïdale et par un sinus modulé en amplitude [4]. Pour limiter les échauffements, nous travaillons systématiquement avec des signaux pulsés avec un rapport cyclique de $1/10$ et des salves de 27 ms .

Tout d’abord, dans la perspective de l’application clinique, il nous importe de vérifier la sélectivité spatiale de l’action de destruction. Des caillots de grande dimension sont donc placés au foyer de notre dispositif ultrasonore et la dimension du trou « percé » par la cavitation générée par l’onde focalisée est mesurée. La figure 4 montre que le diamètre de la lésion augmente avec l’intensité acoustique en corrélation avec le champ acoustique : la limite de la lésion correspond à un seuil d’intensité acoustique voisin de 300 W/cm^2 .

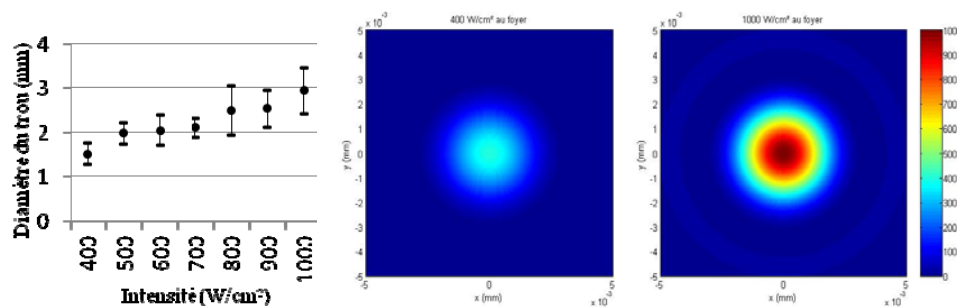


FIG. 4 – Dimension de la lésion réalisée sur un caillot pour différentes intensités acoustiques (à gauche) et champ acoustique sur le plan focal pour deux intensités au foyer (400 W/cm² au centre, et 1000 à droite).

Afin de quantifier l'efficacité de lyse, deux critères sont présentés sur la figure 5. D'une part, en tirant sur des caillots de grande dimension et d'épaisseur fixe, on mesure le temps de percement du caillot ; ce temps diminue régulièrement avec la durée du tir et l'intensité ultrasonore (cf. Fig. 5a). D'autre part, on utilise de petits caillots placés dans des tubes en silicone, fixés au foyer de notre dispositif ultrasonore, et on effectue une pesée du caillot avant et après tir avec une balance de précision ; on observe que la quantité de masse lysée a tendance à augmenter avec l'intensité ultrasonore (cf. Fig. 5b). Par ailleurs, l'excitation modulée apparaît plus efficace que l'excitation sinusoïdale : on obtient 90% de lyse à 1500 W/cm² en sinus contre 900 W/cm² en modulé ; il a été montré que cela est lié à des effets non linéaires. Il faut également noter qu'une trop forte intensité acoustique n'est pas favorable à la lyse ; en effet, la masse lysée rediminue significativement pour des intensités trop élevées, ce qui est vraisemblablement dû à la présence d'un nuage de cavitation trop épais devant le caillot qui fait obstacle à l'onde acoustique : le nuage a donc tendance à se déplacer vers la source.

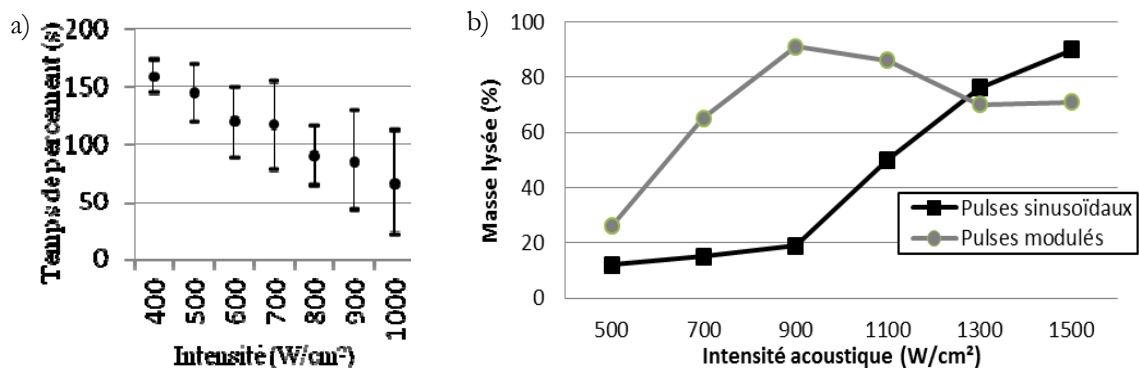


FIG. 5 – Evaluation de la destruction d'un caillot en fonction de l'intensité acoustique :
a) temps de percement d'un caillot de grande dimension et d'épaisseur 5 mm (excitation sinus),
b) pourcentage de masse lysée pour des caillots d'environ 0,7 cm³.

4 Etude des fragments libérés lors de la lyse ultrasonore

On s'intéressera ici d'une part à la quantification des débris générés par la sonothrombolyse, que nous étudierons de façon expérimentale, et d'autre part à leur transit dans l'écoulement au voisinage du caillot, que nous aborderons par des simulations numériques.

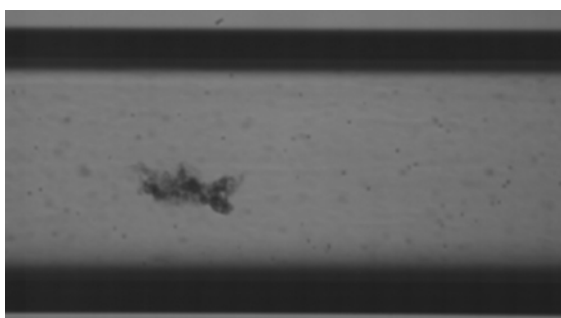


FIG. 6 – Exemple d'image extraite d'une vidéo des débris de caillot libérés :

visualisation du canal d'observation (de hauteur 600 microns) dans lequel circulent les particules relarguées pour être mesurées. On voit ici un "gros" fragment, mais aussi de petits points de taille compatible avec celle de globules rouges.

Des essais de lyse in vitro de caillots placés dans un tube dans une solution de NaCl sont entrepris pour différentes excitations ultrasonores, et les débris générés dans le liquide sont visualisés et comptés. Les résultats présentés ici concernent uniquement de tirs réalisés en l'absence d'écoulement avec une analyse du fluide mis en circulation après le tir [5]. Dans le but de réaliser une destruction quasi totale de caillots centimétriques, un déplacement à vitesse constante est mis en œuvre pour maintenir la surface du caillot au foyer de l'onde ultrasonore au fur et à mesure de la lyse. L'évaluation du nombre des particules est réalisée simultanément par deux dispositifs : par un détecteur de particules (C10/77, Analytical Technology Inc.) qui comptabilise les particules de dimensions supérieure à 200 microns et comprise entre 20 et 200 microns, et par une analyse des images obtenues à la caméra sur une cellule de visualisation (cf. FIG. 6).

On constate tout d'abord que le caillot doit être positionné et déplacé avec soin pour éviter un découpage du caillot susceptible d'en détacher un gros morceau. Cette précaution prise, des particules de taille supérieure à 100 microns (et donc susceptibles dans l'application clinique de boucher des capillaires en aval) s'avèrent pratiquement toujours présentes pour la lyse d'un caillot complet. Comme on peut voir sur l'exemple de la figure 7, l'analyse de la distribution des tailles semble indiquer que la taille des fragments et le nombre de fragments de grosse taille diminuent avec l'intensité acoustique. Concernant la comparaison entre signaux sinusoïdaux (monofréquentiels) et modulés en amplitude (bifréquentiels), il n'apparaît pas de différence flagrante. Cependant, il faut noter une forte variabilité entre les échantillons.

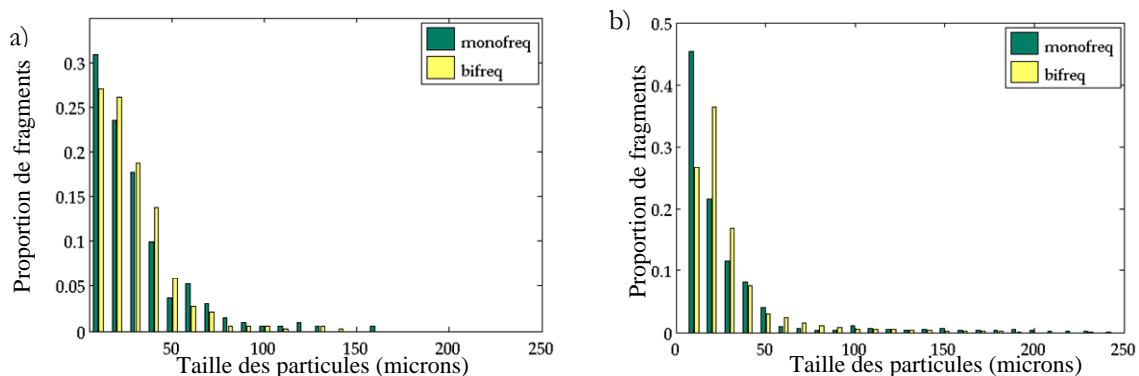


FIG. 7 – Exemples de distribution de taille des fragments libérés pour des tirs à des intensités de (a) $I=1200 \text{ W.cm}^{-2}$ et (b) $I=2000 \text{ W.cm}^{-2}$, pour les mêmes conditions expérimentales.

Afin d'étudier l'écoulement des particules lors de leur libération dans le vaisseau sténosé, des simulations numériques d'un écoulement présentant une contraction sont réalisées, sous le logiciel Fluent® (cf. FIG. 8). Nous avons utilisé le modèle de phase discrète DPM de Fluent® afin de prédire la dispersion de la phase discrète dans la phase continue. Nous avons injecté une seule particule à partir d'une position située au niveau de la sténose avec une vitesse faible caractérisant un fragment qui se détache [6].



FIG. 8 – Schéma et dimensions de la géométrie de la sténose simulée numériquement.

Dans le cas d'un écoulement à un nombre de Reynolds de $Re=500$, les particules de faible diamètre peuvent être piégées dans la zone de recirculation ; par contre à $Re=1000$, les trajectoires se rapprochent d'une ligne de courant pour la phase continue (FIG. 9a). Après son injection, la particule récupère de l'énergie cinétique d'une manière progressive de la part de la phase continue ce que minimise la différence de vitesse entre les deux phases et par conséquent le nombre de Reynolds particulaire chute. Les résultats obtenus peuvent être comparés avec les mesures expérimentales citées dans la littérature [7] pour confirmer la bonne estimation de la force de trainée exercée sur la particule par le fluide à l'aide du modèle DPM.

Nous nous intéressons aussi tout particulièrement à la force de radiation que peut exercer directement le champ acoustique sur les particules relarguées. Cet effet pourrait être exploité pour maintenir plus longtemps les débris de grande taille dans le nuage de cavitation et ainsi permettre leur destruction en plus fines particules avant de les laisser s'échapper dans la circulation. L'intensité acoustique nécessaire pour

contrebalancer les efforts de traînée sur les débris, et donc potentiellement augmenter leur temps de séjour dans la zone de traitement, a été estimée (cf. FIG. 9b). Cette intensité varie en fonction de la force de traînée et du diamètre de la particule : on constate qu'avec les intensités de pulse utilisées dans nos expériences (de l'ordre de 500 W/cm²), nous avons la possibilité d'agir sur les débris de dimension supérieure à 400 microns.

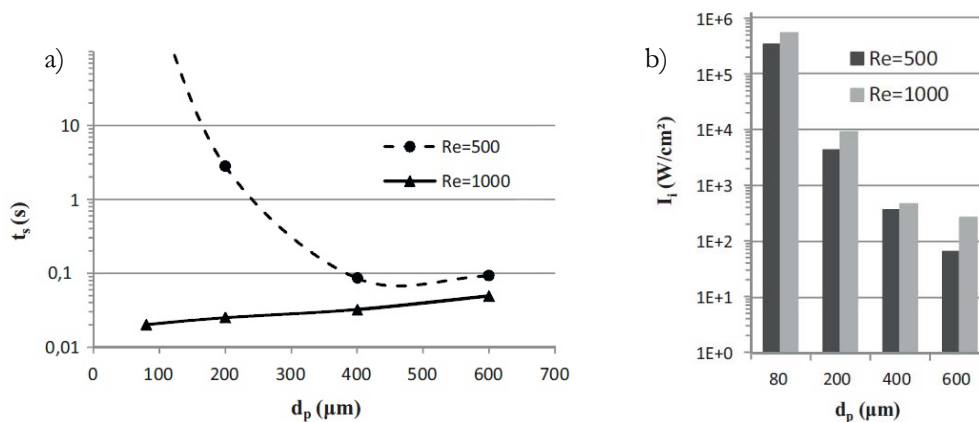


FIG. 9 – Simulations numériques du séjour d'une particule en fonction de son diamètre d_p pour deux valeurs du nombre de Reynolds de l'écoulement :

- a) temps de séjour t_s de la particule dans la zone $0 < x < 2D$ en aval de la sténose,
- b) estimation de l'intensité acoustique minimale I_i à appliquer pour maintenir la particule à la position $x = D$.

5 Conclusion et perspectives

L'étude de nuages de cavitation acoustique et les essais de sonolyse de caillots sanguins in vitro mettent en évidence des paramètres pertinents pour une application thérapeutique des ultrasons extracorporels à la thrombolyse. Des travaux complémentaires sont actuellement en cours pour mieux contrôler les débris de la lyse et pour améliorer la reproductibilité des essais par régulation de la cavitation au cours des tirs [8]. L'étape suivante sera la mise en œuvre d'essais sur un modèle de thrombus in vivo.

Remerciement : Ces travaux bénéficient du soutien de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-Blan-0405 et ANR-2011-JSV5-008-01), de la Région Rhône-Alpes (CMIRA2010), du programme de coopération franco-tunisienne (INSERM/DGRST 10/M02) et du LabEx CeLyA (ANR-10-LABX-60).

Références

- [1] Rosenschein U, Furman V., Kerner E., Fabian I., Bernheim J., and Eshel Y. Ultrasound imaging-guided noninvasive ultrasound thrombolysis - preclinical results. *Circulation*, 102(2), 238–245, 2000.
- [2] Maxwell AD, Cain CA, Duryea AP, Yuan L, Gurm HS, Xu Z (2009). Noninvasive thrombolysis using pulsed ultrasound cavitation therapy - histotripsy, *Ultrasound Med Biol* 35(12), 1982–1994.
- [3] Ben chiekh M, Insera C, Gilles B, Béra JC (2011). Etude de la dynamique d'un nuage de bulles généré par ultrasons focalisés de forte intensité, CFM (Besançon, France).
- [4] Saletes I, Gilles B, Béra JC (2011). Promoting inertial cavitation by nonlinear frequency mixing in a bifrequency focused ultrasound beam, *Ultrasonics*, 51(1), 94-101.
- [5] Dhahbi M, Ben Chiekh M, Gilles B, Béra JC, Jemni A (2012). Effet de l'excitation acoustique sur la distribution de taille des fragments en thrombolyse ultrasonore, COTUME'2012 (Sousse, Tunisie).
- [6] Dhahbi M, Ben Chiekh M, Gilles B, Béra JC, Jemni A (2012). Numerical simulations of particle dynamics in a poststenotic blood vessel region, *Med Eng Phys* 34, 7, 982-989.
- [7] Shuib A, Hoskins P, Easson W (2011). Experimental investigation of particle distribution in a flow through a stenosed artery. *Journal of Mechanical Science and Technology*, 25:357–64.
- [8] Poizat A, Gilles B, Béra JC, Insera C, Desjouis C (2013). Régulation temporelle de l'activité de cavitation ultrasonore : application à la thrombolyse, CFM (Bordeaux, France).